(19)日本国特許庁（ＪＰ）　(12) 公開特許公報（Ａ）　(11)特許出願公開番号

特開平9－157266

(43)公開日　平成9年(1997)6月17日

(51)Int.Cl.⁶	識別記号	庁内整理番号	ＦＩ		技術表示箇所
C07D 303/36			C07D 303/36		
A61K 31/335	ADU ADZ		A61K 31/335	ADU ADZ	
C12P 17/02			C12P 17/02		
//(C12P 17/02					

審査請求　未請求　請求項の数5　ＯＬ　（全 14 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願平7－315542

(22)出願日　平成7年(1995)12月4日

(71)出願人　000173913
財団法人微生物化学研究会
東京都品川区上大崎３丁目14番23号

(72)発明者　竹内　喜雄
東京都品川区東五反田５丁目１番11号　ニューフジマンション701

(72)発明者　土田　外志夫
神奈川県相模原市矢部２丁目３番24号　ハーモニー矢部201号

(72)発明者　中村　光
東京都台東区入谷２丁目39番地９号

(74)代理人　弁理士　八木田　茂　（外２名）

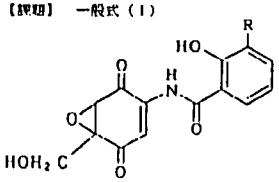
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　新規抗生物質エポキシキノマイシンＡおよびＢとその製造法

(57)【要約】

【課題】　メチシリン耐性菌を含むグラム陽性菌に対する抗菌活性および抗腫瘍活性を示す新しい分子骨格を有する抗生物質を提供する。

【課題】　一般式（Ｉ）



（Ｉ）

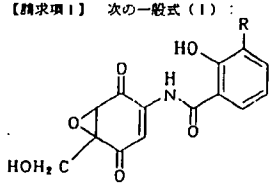
（式中、Ｒはエポキシキノマイシンでは塩素を示し、エポキシキノマイシンＢでは水素を示す）で表わされるエポキシキノマイシンＡおよびエポキシキノマイシンＢが新規抗生物質としてアミコラトプシス sp. MK299-95F4 株の培養により得られた。エポキシキノマイシンＡおよびＢ、あるいはそれらの塩は各種の細菌に対する抗菌活性と抗腫瘍活性とを有する抗生物質である。

(2)　特開平９－１５７２６６

1

【特許請求の範囲】

【請求項１】　次の一般式（Ｉ）：



（Ｉ）

（式中、Ｒはエポキシキノマイシンでは塩素原子を示し、またエポキシキノマイシンＢでは水素原子を示す）で表わされる化合物である抗生物質エポキシキノマイシンＡおよびエポキシキノマイシンＢ、またはそれらの塩。

【請求項２】　アミコラトプシス属に属する、請求項１に記載のエポキシキノマイシンＡおよびＢの生産菌を栄養培地に培養し、培養物からエポキシキノマイシンＡおよび（または）Ｂを採取することを特徴とする、抗生物質エポキシキノマイシンＡおよび（または）エポキシキノマイシンＢの製造法。

【請求項３】　抗生物質エポキシキノマイシンＡおよび（または）エポキシキノマイシンＢ、またはそれらの塩を有効成分とする抗菌剤。

【請求項４】　抗生物質エポキシキノマイシンＡおよび（または）エポキシキノマイシンＢ、またはそれらの塩を有効成分とする抗腫瘍剤。

【請求項５】　抗生物質エポキシキノマイシンＡおよびエポキシキノマイシンＢを生産する特性を持つアミコラトプシス sp. MK299-95F4 株。

【発明の詳細な説明】

【０００１】

【発明の属する技術分野】本発明は、抗菌活性及び抗腫瘍活性または抗癌活性を示す新規抗生物質エポキシキノマイシン(Epoxyquinomicin) ＡおよびエポキシキノマイシンＢ、あるいはこれらの塩に関し、またエポキシキノマイシンＡおよび（または）エポキシキノマイシンＢの製造法に関する。さらに本発明は、エポキシキノマイシンＡおよび（または）エポキシキノマイシンＢまたはそれらの塩を有効成分とする抗菌剤及び抗腫瘍剤に関する。また、本発明は新規抗生物質エポキシキノマイシンＡおよびＢを生産する特性を持つ新規な微生物としてのアミコラトプシス sp. MK299-95F4 株を包含する。

【０００２】

【従来の技術】種々な多数の抗菌性物質が知られており、また種々な多数の抗腫瘍性物質が知られている。

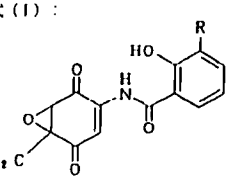
【０００３】

【発明が解決しようとする課題】細菌感染症の化学療法において、多剤耐性菌の出現は重大な問題である。従来知られているまたは使用されている既知の抗菌性化合物とは、異なる化学構造を有し且つ優れた抗菌活性を示す新しい化合物の発見または創製をすることは常に望まれており、そのための研究が行われている。また抗腫瘍性物質は、一般に強い毒性を有するものが多く、その抗腫瘍剤としての使用に当たって大きな制約となっている。そこで、毒性が低く且つ新規な化学構造を有する抗腫瘍性物質を発見または創製することが常に望まれており、そのための研究が行われている。

【０００４】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記の要望に応えることができる抗菌活性及び抗腫瘍活性を持つ新規な抗生物質を提供することを目的に、従来より有用な抗生物質の開発と実用化の研究を促進してきた。その結果、土壌試料から新規な微生物としてアミコラトプシス属に属する菌株を分離することに成功し、またこの菌株が新しい構造骨格を有する複数の抗生物質を生産していることを見い出した。これら新規抗生物質２種を単離することに成功し、それぞれにエポキシキノマイシンＡおよびエポキシキノマイシンＢと命名した。更に、これらの新規抗生物質が薬剤耐性菌（メチシリン耐性菌等）をふくむグラム陽性の細菌に抗菌活性を示し、また癌細胞の増殖に対して抑制活性を示すことを見い出した。

【０００５】すなわち、第１の本発明においては、次の一般式（Ｉ）：



（Ｉ）

（式中、ＲはエポキシキノマイシンＡでは塩素原子を示し、またエポキシキノマイシンＢでは水素原子を示す）で表わされる化合物であるエポキシキノマイシンＡおよびエポキシキノマイシンＢ、あるいはこれらの塩が提供される。

【０００６】エポキシキノマイシンＡおよびＢは、弱酸性物質であり、それらの塩としては、第４級アンモニウム塩などの有機塩基との塩、あるいは各種金属との塩、例えばナトリウムのようなアルカリ金属との塩があり、これらの塩も上記の抗菌活性と抗腫瘍活性を有する。

【０００７】次に、抗生物質エポキシキノマイシンＡおよびＢの理化学的性状を記載する。

(1) エポキシキノマイシンＡの理化学的性状

Ａ）外観及び性質：淡黄色粉体、弱酸性物質

Ｂ）融点：　168－ 173℃（分解）

Ｃ）比旋光度：$[\alpha]_D^{25}$ +44.6°　（c　0.51, メタノール）

Ｄ）ＴＬＣのＲｆ値：0.28

シリカゲル（Art.105715, メルク社製）の薄層クロマト

3

グラフィーで展開溶媒としてクロロホルム－メタノール

E）マススペクトル（m／z）：324，326（M＋H）・
322，324（M－H）・

F）高分解能マススペクトル：実験値 322.0136（M－H）・
計算値 322.0118

C）分子式：$C_{14}H_{19}NO_6$（CIH）紫外線吸収スペクトル：

（I）メタノール溶液中で測定したUV吸収スペクトルは添付図面の図1に示す。主なピークは次のとおりである。

λmax nm（ε）236(sh，8900)，255(sh，5900)，325(8000)，370(sh，2700)

（II）0.01N NaOH－メタノール溶液中で測定したUV吸収スペクトルは添付図面の図2に示す。主なピークは次のとおりである。

λmax nm（ε）234(sh，11600)，257(sh，5100)，327(8300)，371(sh，4400)

（III）0.01N HCl－メタノール溶液中で測定したUV吸収スペクトルは添付図面の図3に示す。主なピークは次のとおりである。

λmax nm（ε）253(6700)，322(8500)

I）赤外線吸収スペクトル（KBr錠剤法）：添付図面

E）マススペクトル（m／z）：289（M）・
288（M－H）・

F）高分解能マススペクトル：実験値 290.0656（M＋H）・
計算値 290.0664

G）分子式：$C_{14}H_{11}NO_6$

H）紫外線吸収スペクトル：

（I）メタノール溶液中で測定したUV吸収スペクトルを添付図面の図7に示す。主なピークは次のとおりである。

λmax nm（ε）237(6100)，253(sh，5400)，328(6300)

（II）0.01N NaOH－メタノール溶液中で測定した吸収スペクトルは添付図面の図8に示す。主なピークは次のとおりである。

λmax nm（ε）235(9100)，259(sh，4000)，324(5800)，376(sh，3400)

（III）0.01N HCl－メタノール溶液中で測定したUVスペクトルは添付図面の図9に示す。主なピークは次のとおりである。

λmax nm（ε）252(5700)，327(6500)

I）赤外線吸収スペクトル（KBr錠剤法）：添付図面

4

（10：1）で展開して測定した場合

$\nu max(cm^{-1})$ 3450，1710，1670，1600，1520，1460，1340，1230

J）^{13}C－NMRスペクトル（CD_3OD／TMS）：添付図面の図5に示す。

K）^1H－NMRスペクトル（CD_3OD／TMS）：添付図面の図6に示す。

【0008】(2) エポキシキノマイシンBの理化学的性状

A）外観及び性質：淡黄色粉体，弱酸性物質

B）融点：178－184℃（分解）

C）比旋光度：$[\alpha]_D^{25}$ ＋32.2°（c 0.51，メタノール）

D）TLCのRf値：0.52

シリカゲル（Art.105715，メルク社製）の薄層クロマトグラフィーで展開溶媒としてクロロホルム－メタノール（10：1）で展開して測定した場合

$\nu max(cm^{-1})$ 3430，1710，1660，1610，1530，1340，1230

J）^{13}C－NMRスペクトル（CD_3OD／TMS）：添付図面の図11に示す。

K）^1H－NMRスペクトル（CD_3OD／TMS）：添付図面の図12に示す。

【0009】さらに、抗生物質エポキシキノマイシンAおよびBの生物学的性状を次に記載する。

【0010】A）抗菌活性

本発明による抗生物質エポキシキノマイシンAおよびBの普通栄養寒天板上での各種細菌に対する最低発育阻止濃度は、次の表1にしめす通りである。この抗菌スペクトルは日本化学療法学会標準法に基ずき、ミュラーヒントン寒天培地で倍数希釈法により測定した。

【0011】

5

（表1）

試験菌	最低発育阻止濃度（μg/ml）	
	エポキシキノマイシンA	エポキシキノマイシンB
スタヒロコッカス・アウレウス FDA 209P	12.5	12.5
スタヒロコッカス・アウレウス・スミス	12.5	12.5
スタヒロコッカス・アウレウス MS 9610	50	25
スタヒロコッカス・アウレウス MRSA No.5	25	25
スタヒロコッカス・アウレウス MS 16526	25	25
スタヒロコッカス・アウレウス TY-04282	50	25
ミクロコッカス・ルテウス FDA 16	12.5	25
ミクロコッカス・ルテウス IFO 3333	9.12	0.25
バシルス・アンスラシス	25	12.5
バシルス・サブチリス NRRL B-558	50	12.5
バシルス・セレウス ATCC 10702	25	12.5
コリネバクテリウム・ボビス 1810	50	50
エシェリヒア・コリ NIHJ	100	50
エシェリヒア・コリ BE 1121	50	50
エシェリヒア・コリ BB 1186	50	50
シゲラ・デイセンテリエ JS 11910	50	50
シウドモナス・エルギノサ A 3	>50	>50
パストレラ・ピシシダ sp.6395	12.5	12.5
パストレラ・ピシシダ sp.0356	12.5	12.5
パストレラ・ピシシダ p－3347	3.12	12.5

【0012】B）癌細胞増殖抑制活性

各種の癌細胞を用いて癌細胞の増殖を50%抑制するエポキシキノマイシンAおよびエポキシキノマイシンBの濃度（IC_{50}値）を、MTT法（「Journal of Immunological Methods」65巻，55－60頁(1983)参照）で測定した。その結果を表2に示す。

【0013】

（表2）

供試癌細胞	IC_{50}（μg/ml）	
	エポキシキノマイシンA	エポキシキノマイシンB
マウス白血病 L1200	2.64	16.3
マウス IMCカルシノーマ	9.87	17.9
マウスサルコーマ S180	7.67	
マウス黒色腫 B16－BL6	7.97	

【0014】表1の結果から明らかなように、本発明による抗生物質エポキシキノマイシンAおよびBは、各種の細菌に対して抗菌活性を有するから抗菌剤として有用である。また、表2の結果から明らかなように、エポキシキノマイシンAおよびBは各種の癌細胞の増殖を抑制する抗腫瘍活性または抗癌活性を有するから抗腫瘍剤ま

たは抗癌剤として有用である。

【００１５】さらに第２の本発明によれば、アミコラトプシス属に属する、前記の一般式（Ｉ）のエポキシキノマイシンＡおよびＢの生産菌を栄養培地に培養し、培養物からエポキシキノマイシンＡおよび（または）エポキシキノマイシンＢを採取することを特徴とする、抗生物質エポキシキノマイシンＡおよび（または）エポキシキノマイシンＢの製造法が提供される。

【００１６】第２の本発明の方法で使用できるエポキシキノマイシンＡおよびＢの生産菌の一例としては、アミコラトプシス sp. MK299-95F4 株がある。この菌株は平成６年10月、微生物化学研究所において、宮城県仙台市の土壌より分離された放線菌で、MK299-95F4の菌株番号が付された微生物である。

【００１７】このMK299-95F4株の菌学的性状を次に記載する。

Ｉ．形態

基生菌糸はよく分枝し、ジクザグ状を呈する。また分断が認められる。気菌糸は直状あるいは不規則な曲状で、円筒形～長円形の断片または胞子様の構造に分断する。その表面は平滑であり、大きさは約 0.4～ 0.6× 1.1～ 1.6ミクロンである。鞭生枝、菌束糸、胞子のう及び運動性胞子は認められない。

【００１８】２．各種培地における生育状態

色の記載について〔 〕内に示す標準は、コンティナー・コーポレーション・オブ・アメリカのカラー・ハーモニー・マニュアル（Container Corporation ofAmerica のcolor harmony manual）を用いた。

(1) シュクロース・硝酸塩寒天培地（27℃培養）

無色の発育上に、白の気菌糸をうっすらと着生し、溶解性色素は認められない。

(2) グルコース・アスパラギン寒天培地（27℃培養）

うす黄〔2ea, Lt Wheat～2gc, Bamboo〕の発育上に、白の気菌糸を着生し、溶解性色素は黄を帯びる。

(3) グリセリン・アスパラギン寒天培地（ＩＳＰ－培地５、27℃培養）

うす黄茶〔3le, Camel～3le, Cinnamon〕の発育上に、白の気菌糸を着生し、溶解性色素は黄茶を帯びる。

(4) スターチ・無機塩寒天培地（ＩＳＰ－培地４、27℃培養）

無色の発育上に、白の気菌糸をうっすらと着生し、溶解性色素は認められない。

【００１９】(5) チロシン寒天培地（ＩＳＰ－培地７、27℃培養）

うす黄茶〔2lg, Mustard Tan〕～灰味黄茶〔3lg, Adobe Brown〕の発育上に、白の気菌糸を着生し、溶解性色素はうす黄茶を呈する。

(6) 栄養寒天培地（27℃培養）

うす黄〔2ea, Lt Wheat〕の発育上に、白の気菌糸をうっすらと着生し、溶解性色素は認められない。

(7) イースト・麦芽寒天培地（ＩＳＰ－培地２、27℃培養）

うす黄茶〔3lc, Lt Amber〕の発育上に、白の気菌糸をうっすらと着生し、溶解性色素は認められない。

(8) オートミール寒天培地（ＩＳＰ－培地３、27℃培養）

無色～うす黄〔Ｉ 1/2ca, Cream〕の発育上に、白の気菌糸をうっすらと着生し、溶解性色素は認められない。

(9) スターチ寒天培地（27℃培養）

無色の発育上に、白の気菌糸をうっすらと着生し、溶解性色素は認められない。

(10) リンゴ酸石灰寒天培地（27℃培養）

無色の発育上に、白の気菌糸をうっすらと着生し、溶解性色素は認められない。

【００２０】３．生理的性質

(1) 生育温度範囲

グルコース・アスパラギン寒天培地（グルコース 1.0 %、Ｌ－アスパラギン0.05%、リン酸水素二カリウム 0.05%、ひも寒天 3.0%、 pH7.0）を用い、10℃、20℃、24℃、27℃、30℃、37℃および50℃の各温度で試験した結果、10℃、50℃での生育は認められず、20℃～37℃の範囲で生育した。生育至適温度は27℃付近と思われる。

(2) スターチの加水分解（スターチ・無機塩寒天培地、ＩＳＰ－培地４及びスターチ寒天培地、いずれも27℃培養）

21日間の培養で、いずれの培地においても陰性である。

(3) メラニン様色素の生成（トリプトン・イースト・ブロス、ＩＳＰ－培地１；ペプトン・イースト・鉄寒天培地、ＩＳＰ－培地６；チロシン寒天培地、ＩＳＰ－培地７；いずれも27℃培養）

いずれの培地においても陰性である。

【００２１】(4) 炭素源の利用性（プリドハム・ゴドリーブ寒天培地、ＩＳＰ－培地９；27℃培養）

Ｄ－グルコース、Ｄ－フルクトース、イノシトール、Ｄ－マンニトールを利用して発育し、Ｌ－アラビノース、シュクロース、ラムノース、ラフィノースは利用しない。Ｄ－キシロースの利用の存否は判然としない。

(5) リンゴ酸石灰の溶解（リンゴ酸石灰寒天培地、27℃培養）

培養後１０日目頃よりリンゴ酸石灰の溶解が認められ、その作用は中等度である。

(6) 硝酸塩の還元反応(0.1%硝酸カリウム含有ペプトン水、ＩＳＰ－培地８、27℃培養)

陰性である。

【００２２】以上の性状を要約すると、MK299-95F4株は、その形態上、基生菌糸はよく分枝し、ジグザク状を呈し、分断を認める。気菌糸は直状あるいは不規則な曲状で、円筒形～長円形の断片または胞子様の構造に分断する。鞭生枝、菌束糸、胞子のう及び運動性胞子は認められない。種々の培地で、無色～うす黄～うす黄茶の発育上に白の気菌糸を着生する。一部の培地で溶解性色素は黄あるいは黄茶を帯びる。メラニン様色素の生成、スターチの水解性及び硝酸塩の還元反応はいずれも陰性である。

【００２３】ところで、MK299-95F4株の菌体成分は、細胞壁にメソ型の２，６－ジアミノピメリン酸、アラビノース及びガラクトースを含み、細胞壁タイプIV型を示した。全菌体中の還元糖はアラビノース、ガラクトースを含むＡ型であった。グリコレートテストの結果はアセチル型であった。また、ミコール酸は含有せず、リン脂質はPII型（ホスファチジルエタノールアミンを含みホスファチジルコリン及び未知のグルコサミン含有リン脂質を含まない）、主要なメナキノンはＭＫ－９（Ｈ4）であった。脂肪酸は16：０，１－15：０，16：１，１－16：０及び17：０を主成分とした。

【００２４】以上の結果より、MK299-95F4株はアミコラトプシス(Amycolatopsis) 属（文献：「International Journal of Systematic Bacteriology」36巻，29－37頁，1986年）に属するものと考えられる。アミコラトプシス属の既知菌種を検索すると、アミコラトプシス・スルフレア(Amycolatopsis sulphurea)（文献１：同上；および文献２：「International Journal of Systematic Bacteriology」37巻，292－ 295頁，1987年）が、近縁の種としてあげられた。そこで、MK299-95F4株とアミコラトプシス・スルフレアの当研究所保存菌株とを実地に比較検討中である。現時点ではMK299-95F4株をアミコラトプシス・エスピー(Amycolatopsis sp.) MK299-95F4とする。なお、MK299-95F4株を工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託申請し、平成７年10月17日、寄託番号がFERM P-15243として受託された。

【００２５】第２の本発明の方法を実施するに当っては、アミコラトプシス属に属するエポキシキノマイシンＡおよびＢの生産菌を栄養培地に接種し、この培地中で培養する。ここで用いる栄養培地は、前記の生産菌が資化できる炭素源と窒素源を栄養成分として含有するものである。

【００２６】その栄養源としては、通常微生物の栄養源として通常使用されるもの、例えば炭素源、窒素源、無機塩などの同化できる栄養源を使用できる。例えば、ぶどう糖、麦芽糖、糖蜜、デキストリン、グリセリン、澱粉などの炭化水素や、大豆油、落花生油などの油脂のごとき炭素源、ならびにペプトン、肉エキス、綿実粉、大豆粉、酵母エキス、カゼイン、コーン・スチープリカー、ＮＺ－アミン、硫酸アンモニウム、硝酸アンモニウム、塩化アンモニウムなどの窒素源、さらに炭酸二カリウム、塩酸ナトリウム、食塩、炭酸カルシウム、硫酸マグネシウム、塩化マンガンなどの無機塩が使用でき、必要により微量金属例えばコバルト、鉄などを添加することができる。栄養源としては、その他、抗生物質エポキシキノマイシンＡおよびＢを生産するのに使用菌が利用しうるものであればいずれの公知の栄養源でも使用できる。

【００２７】培地における上記のごとき栄養源の配合割合は特に制約されるものでなく、広範囲に亘って変えることができ、使用するエポキシキノマイシンＡおよびＢ生産菌によって、最適の栄養源の組成及び配合割合は、当事者であれば簡単な小規模実験により容易に決定することができる。また、上記の栄養源からなる栄養培地は、培養に先立ち殺菌することができ、この殺菌の前又は後で、培地のｐＨを６－８の範囲、特にpH 6.5－ 7.5の範囲に調節するのが有利である。

【００２８】かかる栄養培地でのエポキシキノマイシンＡおよびＢ生産菌の培養は、一般の放線菌による抗生物質の製造において通常使用されている方法に準じて行なうことができる。通常は好気条件下に培養するのが好適であり、撹拌しながら及び／又は通気しながら行なうことができる。また、培養方法としては静置培養、振とう培養、通気撹拌をともなう液内培養のいずれも使用可能であるが、液体培養がエポキシキノマイシンＡおよびＢの大量生産に適している。

【００２９】使用しうる培養温度はエポキシキノマイシンＡおよびＢ生産菌の発育が実質的に阻害されず、該抗生物質を生産しうる範囲であれば、特に制限されるものではなく、使用する生産菌に応じて適宜選択できるが、特に好ましいのは25－30℃の範囲内の温度を挙げることができる。培養は通常はエポキシキノマイシンＡおよびＢが十分に蓄積するまで継続することができる。その培養時間は培地の組成や培養温度、使用温度、使用生産菌株などにより異なるが、通常72－ 120時間の培養で目的の抗生物質を得ることができる。

【００３０】培養中の培地内のエポキシキノマイシンＡおよびＢの蓄積量はスタヒロコッカス・アウレウス・スミスを使用して、通常の抗生物質の定量に用いられる円筒平板法により定量することができる。

【００３１】かくして培養物中に蓄積されたエポキシキノマイシンＡおよびＢは、これを培養物から採取する。培養後、必要により、濾過、遠心分離などのそれ自体公知の分離方法によって培養物から菌体を除去した後、その培養濾液を酸性(pH 2－4）に調整し有機溶媒、特に酢酸エチルなどを用いた溶媒抽出や、吸着やイオン交換能を利用したクロマトグラフィー、ゲル濾過、向流分配を利用したクロマトグラフィーを単独でまたは、組み合わせて使用することにより単離精製して目的の抗生物質を採取することができる。吸着やイオン交換能を有するクロマトグラフィー用担体としては、活性炭、シリカゲル、多孔性ポリスチレンージビニルベンゼン樹脂もしくは各種のイオン交換樹脂を用いることができる。また、分離した菌体からは、適当な有機溶媒を用いた溶媒抽出法や菌体破砕による溶出法により菌体から目的の抗生物

質を抽出し、上記と同様に単離精製することができる。かくして、前記した特性を有する新規抗生物質エポキシキノマイシンAおよびBが得られる。

【００３２】さらに、第３の本発明では、一般式（Ｉ）で表されるエポキシキノマイシンAおよび（または）エポキシキノマイシンBまたはそれらの製薬学的に許容できる塩を有効成分とする抗菌剤が提供される。

【００３３】また、第４の本発明においては、一般式（Ｉ）で表されるエポキシキノマイシンAおよび（または）エポキシキノマイシンBまたはそれらの製薬学的に許容できる塩を有効成分とする抗腫瘍剤が提供される。

【００３４】この抗菌剤または抗腫瘍剤においては、有効成分としてのエポキシキノマイシンAおよび（または）Bあるいはその塩は製薬学的に許容できる常用の固体または液体担体、例えばエタノール、水、でん粉等と混和されている形の組成物であることができる。

【００３５】また、第５の本発明では、新規な微生物として、前記の一般式（Ｉ）のエポキシキノマイシンAおよびBを生産する特性を持つアミコラトプシス sp. MK299-95F4 株が提供される。

【００３６】

【発明の実施の形態】次に実施例により本発明を更に詳細に説明するが、本発明は下記の実施例に限定されるものでない。

【００３７】実施例１　抗生物質エポキシキノマイシンAおよびBの製造

グリセリン 0.5%、シュークロース　２%、大豆粉　１%、乾燥酵母　１%、コーン・スチープ・リカー 0.5%、塩化コバルト 0.001%を含む液体培地(pH7.0に調整)を三角フラスコ(500ml容)に 110mlずつ分注し、常法により 120℃で20分滅菌した。これらの培地に、寒天斜面培地に培養したアミコラトプシス sp.MK299-95F4 株（FERM P-15243）を接種し、その後30℃で５日間回転振とう培養した。これにより種母培養液を得た。

【００３８】グリセリン　２%、デキストリン　２%、バクトーソイトン　１%、粉末酵母エキス 0.3%、硫酸アンモニウム 0.2%、炭酸カルシウム 0.2%、シリコーンオイル１滴を含む液体培地(pH7.4に調整)を三角フラスコ(500ml容)に 110mlずつ分注し、常法により 120℃で20分滅菌した。その後、これら培地に、上記種母培養液をそれぞれ２mlずつ接種し、27℃で４日間回転振とう培養した。

【００３９】このようにして得られた培養液を濾過して菌体を分離した。培養ろ液2.55リットルは、６N－HClによりpH２にした後に酢酸ブチル2.55リットルで抽出し、酢酸ブチル層を無水硫酸ナトリウムにより乾燥した。酢酸ブチル層を減圧下で濃縮乾固し、残渣をメタノール50mlに溶かしヘキサン50mlで２回洗浄し、メタノール層を減圧下で濃縮乾固した。

【００４０】得られた残渣をクロロホルムーメタノールー水(50：10：40,100ml)で分配し、下層を減圧下で濃縮乾固すると、茶色の油状物(0.515ｇ）が得られた。この油状物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（Kiesel gel 60, メルク社製, 50ml）に付し、トルエンーアセトン混合溶媒（10：１，７：１，５：１，３：１，２：１）で順次溶出した。得られた活性画分を同条件のシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し、トルエンーアセトン混合溶媒（50：１，20：１，10：１，７：１）で順次溶出した。エポキシキノマイシンAおよびBの混合物が 124mg得られた。この混合物の35mgをシリカゲルＴＬＣ（展開溶媒：クロロホルムーメタノール，20：１）にかけて分離精製した。

【００４１】エポキシキノマイシンAが融点 168～ 173℃（分解）の淡黄色粉末として20mgの収量で得られ、またエポキシキノマイシンBが融点 178～ 184℃（分解）の淡黄色粉末として10mgの収量で得られた。

【図面の簡単な説明】

【図１】エポキシキノマイシンAのメタノール溶液中の紫外線吸収スペクトルである。

【図２】エポキシキノマイシンAの0.01Ｎ　NaOHーメタノール溶液中の紫外線吸収スペクトルである。

【図３】エポキシキノマイシンAの0.01Ｎ HClーメタノール溶液中の紫外線吸収スペクトルである。

【図４】エポキシキノマイシンAのＫＢｒ錠剤法で測定した赤外線吸収スペクトルである。

【図５】エポキシキノマイシンAの重メタノール溶液（内部標準：トリメチルシラン）にて測定したプロトン核磁気共鳴スペクトルである。

【図６】エポキシキノマイシンAの重メタノール溶液（内部標準：トリメチルシラン）にて測定した炭素13核磁気共鳴スペクトルである。

【図７】エポキシキノマイシンBのメタノール溶液の紫外線吸収スペクトルである。

【図８】エポキシキノマイシンBの0.01Ｎ　NaOHーメタノール溶液中の紫外線吸収スペクトルである。

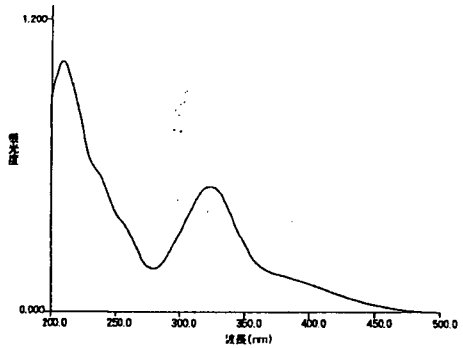
【図９】エポキシキノマイシンBの0.01Ｎ HClーメタノール溶液中の紫外線吸収スペクトルである。

【図１０】エポキシキノマイシンBのＫＢｒ錠剤法で測定した赤外線吸収スペクトルである。

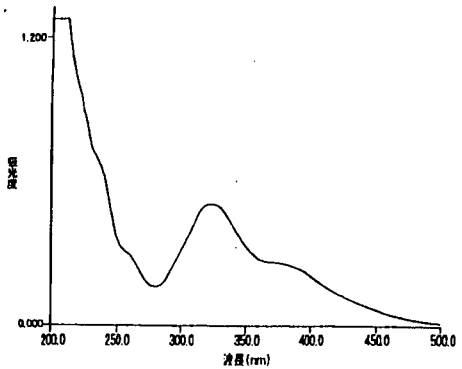
【図１１】エポキシキノマイシンBの重メタノール溶液（内部標準：トリメチルシラン）にて測定したプロトン核磁気共鳴スペクトルである。

【図１２】エポキシキノマイシンBの重メタノール溶液（内部標準：トリメチルシラン）にて測定した炭素13核磁気共鳴スペクトルである。

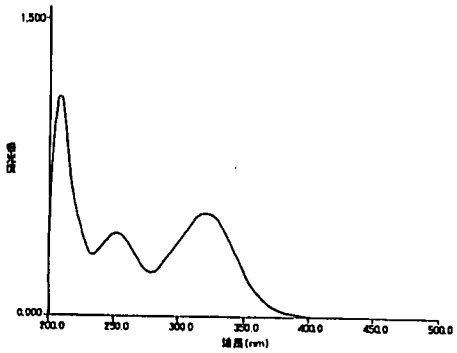
【図１】



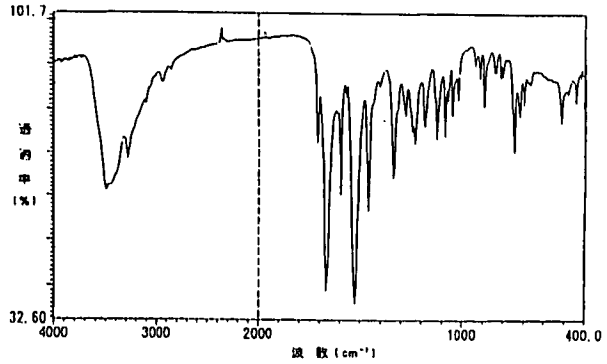
【図２】



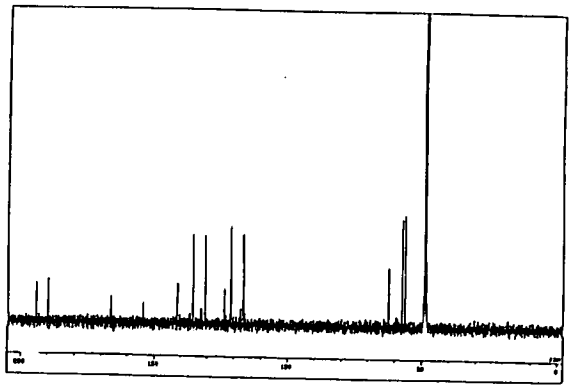
【図3】


1.500
0.000
200.0
250.0
300.0
350.0
400.0
450.0
500.0
波長(nm)

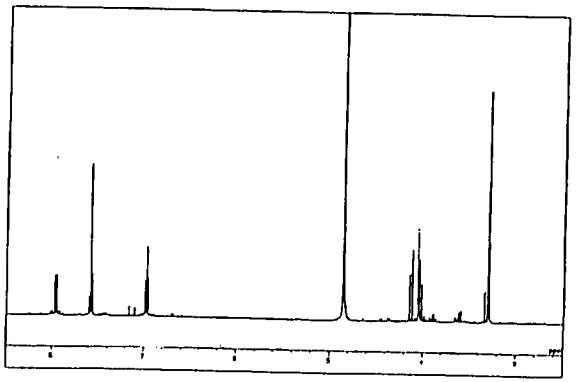
【図4】


101.7
32.60
透過率(%)
4000
3000
2000
1000
400.0
波数(cm⁻¹)

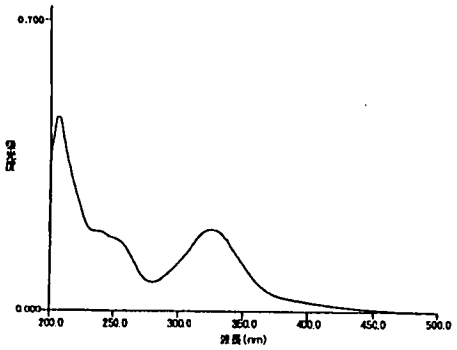
【図5】



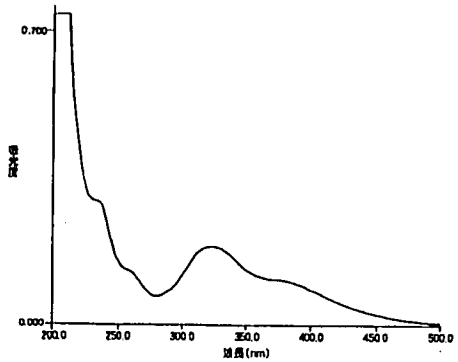
【図6】



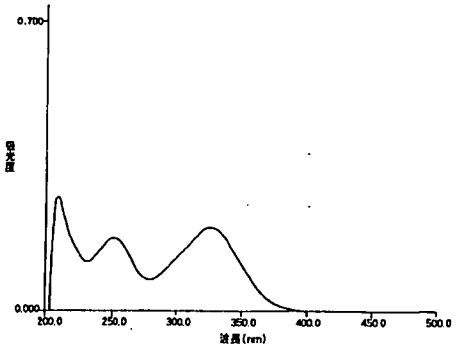
【図7】


0.700
0.000
200.0
250.0
300.0
350.0
400.0
450.0
500.0
波長(nm)

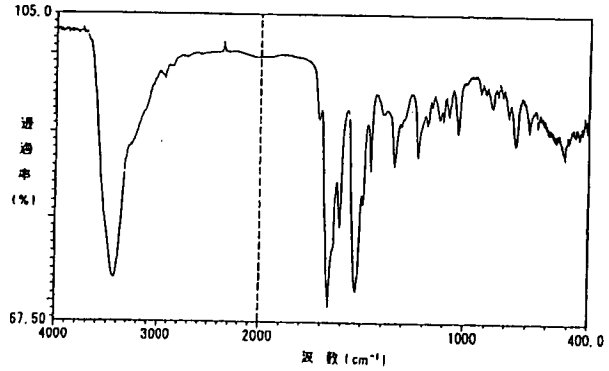
【図8】


0.700
0.000
200.0
250.0
300.0
350.0
400.0
450.0
500.0
波長(nm)

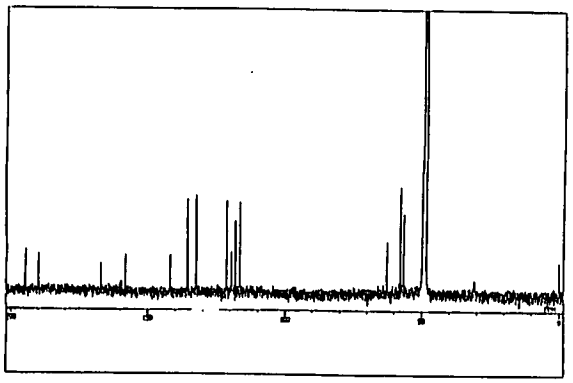
【図9】


0.700
0.000
200.0
250.0
300.0
350.0
400.0
450.0
500.0
波長(nm)

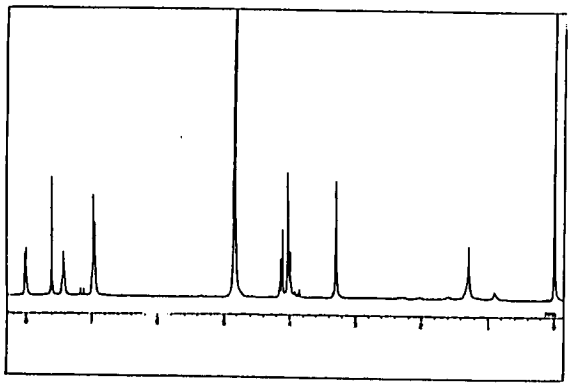
【図10】


105.0
67.50
透過率(%)
4000
3000
2000
1000
400.0
波数(cm⁻¹)

【図11】



【図12】



【手続補正書】
【提出日】平成8年4月26日
【手続補正1】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】0010
【補正方法】変更
【補正内容】
【0010】A）抗菌活性

本発明による抗生物質エポキシシキノマイシンAおよびBの各種細菌に対する最低発育阻止濃度は、次の表1にしめす通りである。この抗菌スペクトルは日本化学療法学会標準法に基ずき、ミュラーヒントン寒天培地で倍数希釈法により測定した。

【手続補正2】
【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0021
【補正方法】変更
【補正内容】
【0021】(4) 炭素源の利用性（プリドハム・ゴドリーブ寒天培地、ＩＳＰ－培地９：27℃培養）
d－グルコース、d－フルクトース、イノシトール、d－マンニトールを利用して発育し、l－アラビノース、シュクロース、ラムノース、ラフィノースは利用しない。d－キシロースの利用の存否は判然としない。
(5) リンゴ酸石灰の溶解（リンゴ酸石灰寒天培地、27℃培養）
培養後１０日目頃よりリンゴ酸石灰の溶解が認められ、その作用は中等度である。
(6) 硝酸塩の還元反応(0.1%硝酸カリウム含有ペプトン水、ＩＳＰ－培地８、27℃培養)
陰性である。

フロントページの続き

(51)Int.Cl.[6]	識別記号	庁内整理番号	FI	技術表示箇所
C12R 1:01)				

(72)発明者 飯沼 克信
神奈川県横浜市緑区白山４丁目61番17号
(72)発明者 潭 力
神奈川県綾瀬市綾西四丁目６番７号
(72)発明者 長縄 博
東京都大田区田園調布本町３番17号
(72)発明者 浦田 雅
東京都新宿区内藤町１番地26 秀和レジデンス405号

NOVEL ANTIBIOTICS EPOXYQUINOMICINS A AND B, AND METHOD FOR PRODUCING THE SAME

ABSTRACT

PROBLEM

Antibiotics with new molecular skeletons that exhibit antibacterial activity and antitumor activity against Gram-positive bacteria including methicillin resistant Staphylococcus aureus (MRSA) are provided.

PROBLEM

Epoxyquinomicin A and epoxyquinomicin B, represented by the general formula (I), were obtained as novel antibiotics by culturing Amycolatopsis sp. MK299-95F4.

(wherein R represents chlorine and hydrogen in epoxyquinomicin A and epoxyquinomicin B, respectively) Epoxyquinomicins A and B or their salts are antibiotics with antibacterial activity and antitumor activity against various bacteria.

CLAIMS

1. Epoxyquinomicin A and epoxyquinomicin B, which are compounds represented by the following general formula (I) or their salts,

(wherein R represents chlorine and hydrogen in epoxyquinomicin A and epoxyquinomicin B, respectively).

2. A method for producing the antibiotics epoxyquinomicins A and (or) B, comprising the steps of culturing in a nutrient medium a bacterium of the genus Amycolatopsis, which produces epoxyquinomicins A and B of claim 1, and isolating epoxyquinomicins A and (or) B from the resulting culture.

3. An antibacterial agent, comprising epoxyquinomicin A and (or) epoxyquinomicin B or their salt(s) as active

ingredient(s).

4. An antitumor agent, comprising epoxyquinomicin A and (or) epoxyquinomicin B or their salt(s) as active ingredient(s).

5. Amycolatopsis sp. MK299-95F4, which has the property of producing the antibiotics epoxyquinomicin A and epoxyquinomicin B.

BRIEF SUMMARY OF THE INVENTION

[0001]

TECHNICAL FIELD

The present invention relates to novel antibiotics epoxyquinomicin A and epoxyquinomicin B with antibacterial activity and antitumor/anticancer activity or their salts, and also to a method for producing epoxyquinomicins A and (or) epoxyquinomicin B. The present invention further relates to antibacterial agents and antitumor agents which contain epoxyquinomicin A and (or) epoxyquinomicin B or their salt as active ingredient(s). In addition, the present invention encompasses Amycolatopsis sp. MK299-95F4, which has the property of producing the antibiotics epoxyquinomicin A and epoxyquinomicin B.

[0002]

DESCRIPTION OF THE RELATED ART

Large numbers of various antibacterial agents and large numbers of various antitumor substances are known.

[0003]

PROBLEM TO BE SOLVED BY THE INVENTION

The emergence of multidrug-resistant bacteria is a major concern in the chemotherapy of microbism. Discovery and development of new compounds that have different chemical structures from known antibacterial compounds currently used or conventionally known and that exhibit excellent antibacterial activity have always been awaited and thus studies aimed at that scope has been promoted. In general, most antitumor substances have strong toxicity, which poses serious limitations to their use as antitumor agents. Discovery and

development of new compounds that are less toxic with novel chemical structures have always been awaited and thus studies aimed at that scope has been promoted.

[0004]

MEANS FOR SOLVING THE PROBLEMS

The inventors have long promoted the research and development of useful antibiotics and their practical use for the purpose of providing novel antibiotics with the antibacterial activity and antitumor activity that can meet the aforementioned request. As a result, we have succeed in isolating a strain of the genus Amycolatopsis as a novel microorganism from soil samples and found the strain produces a plurality of antibiotics with new structural skeletons. We have successfully isolated two new types of novel antibiotics and named each epoxyquinomicin A and epoxyquinomicin B. Further, we have found that these novel antibiotics exhibit antibacterial activity against Gram-positive bacteria including drug-resistant bacteria (methicillin resistant Staphylococcus aureus etc.) and suppressive activity on proliferation of cancer cells.

[0005] Accordingly, in a first aspect of the present invention, there is provided epoxyquinomicin A and epoxyquinomicin B, which are compounds represented by the following general formula (I) or their salts,

(wherein R represents chlorine and hydrogen in epoxyquinomicin A and epoxyquinomicin B, respectively)

[0006] Epoxyquinomicins A and B are acescent substances. Their salts include salts with organic bases, such as quaternary ammonium salt, or salts with various metals, and salts with alkali metals, such as sodium. These salts also have the aforementioned antibacterial activity and antitumor activity.

[0007] Hereinbelow, the physical and chemical properties of the antibiotic epoxyquinomicins A is described.

(1) The physical and chemical properties of the antibiotic epoxyquinomicins A

A) Appearance and properties: light yellow powder, acescent substance

B) Melting point: 168-173°C (degradation)

C) Specific rotation: $[\alpha]_D^{25}$ + 44.6° (c 0.51, methanol)

D) Rf value in TLC: 0.28

When developed on silica gel-coated thin layer chromatography plates (Merck Art 105715) using chloroform/MeOH = 10:1 as a developing solvent

E) Mass spectrum (m/z): 324,326 $(M+H)^+$
322,324 $(M-H)^-$

F) High resolution mass spectrum:
Experimental value 322.0136 $(M-H)^-$
Calculated value 322.0118

G) Molecular formula: $C_{14}H_{10}NO_6Cl$

H) Ultraviolet absorption spectra:

(i) UV absorption spectrum measured in methanol solution is shown in FIG. 1 of the accompanying drawing. The characteristic peaks are as follows:

λ max nm (ε) 236 (sh, 8900), 255 (sh, 5900), 325 (8000), 370(sh, 2700)

(ii) UV absorption spectrum measured in 0.01N NaOH-methanol solution is shown in FIG. 2 of the accompanying drawing. The following characteristic peaks were observed:

λ max nm (ε) 234(sh, 11600), 257(sh, 5100), 327(8300), 371(sh, 4400)

(iii) UV absorption spectrum measured in 0.01N NCl-methanol solution is shown in FIG. 3 of the accompanying drawing. The following characteristic peaks were observed:

λ max nm (ε) 253(6700), 322(8500)

I) Infrared absorption spectrum (the KBr tablet method): shown in FIG.4 of the accompanying drawing.

ν max (cm^{-1}) 3450, 1710, 1670, 1600, 1520, 1460, 1340, 1230

J) ^{13}C-NMR spectrum (CD_3OD/TMS): shown in FIG. 5 of the accompanying drawing.

K) ^{1}H-NMR spectrum (CD_3OD/TMS): shown in FIG. 6 of the

accompanying drawing.

[0008] (2) The physical and chemical properties of the antibiotic epoxyquinomicins B

A) Appearance and properties: light yellow powder, acescent substance

B) Melting point: 178-184°C (degradation)

C) Specific rotation: $[\alpha]_D^{25}$ + 32.2 (c 0.51, methanol)

D) Rf value in TLC: 0.52

When developed on silica gel-coated thin layer chromatography plates (Merck Art 105715) using chloroform/MeOH = 10:1 as a developing solvent

E) Mass spectrum (m/z): 289 $(M)^+$
288 $(M-H)^-$

F) High-resolution mass spectrum:
Experimental value 290.0656 $(M+H)^+$
Calculated value 290.0664

G) Molecular formula: $C_{14}H_{11}NO_6$

H) Ultraviolet absorption spectra:

(i) UV absorption spectrum measured in methanol solution is shown in FIG. 7 of the accompanying drawing. The following characteristic peaks can be observed:

λ max nm (ε) 237(6100), 253(sh, 5400), 326(6300),

(ii) UV absorption spectrum measured in 0.01N NaOH-methanol solution is shown in FIG. 8 of the accompanying drawing. The following characteristic peaks were observed:

λ max nm (ε) 235 (9100), 259 (sh, 4000), 327 (5800), 376 (sh, 3400)

(iii) UV spectrum measured in 0.01N NCl-methanol solution is shown in FIG. 9 of the accompanying drawing. The following characteristic peaks were observed:

λ max nm (ε) 252(5700), 327(6500)

I) Infrared absorption spectrum (the KBr tablet method): shown in FIG. 10 of the accompanying drawing.

ν max (cm^{-1}) 3430, 1710, 1660, 1610, 1530, 1340, 1230

J) ^{13}C-NMR spectrum (CD_3OD/TMS): shown in FIG. 11 of the accompanying drawing.

K) ^{1}H-NMR spectrum (CD_3OD/TMS): shown in FIG. 12 of the accompanying drawing.

[0009] Further, the biological properties of the antibiotics epoxyquinomicins A and B are described below.

[0010] A) Antibacterial activity

The minimum growth inhibition concentrations of the antibiotics epoxyquinomicins A and B according to the present invention against various bacteria on a normal nutrient agar plate is as shown in Table 1 below. This antibacterial spectrum was obtained by the two-fold dilution method by the Muller-Hinton agar medium according to the standard method recommended by Japanese Society of Chemotherapy.

[0011]

Test microorganisms	Minimum growth inhibition concentration (μg/ml)	
	epoxyquinomicin A	epoxyquinomicin B
Staphylococcus aureus FDA 209P	12.5	12.5
Staphylococcus aureus Smith	12.5	12.5
Staphylococcus aureus MS 9610	50	25
Staphylococcus aureus MRSA No.5	25	25
Staphylococcus aureus MS 16526	25	25
Staphylococcus aureus TY-04282	50	25
Micrococcus luteus FDA-16	12.5	25
Micrococcus luteus IFO 3333	3.12	6.25
Bacillus anthracis	25	12.5
Bacillus subtilis NRRL B-558	50	12.5
Bacillus cereus ATCC 10702	25	12.5
Corynebacterium bovis 1810	50	50
Escherichia coli NIHJ	100	50
Escherichia coli BE 1121	50	50
Escherichia coli BE 1186	50	50
Shigella dysenteriae JS 11910	50	50
Pseudomanas aeruginosa A3	>50	>50
Pasteurella piscicida sp. 6395	12.5	12.5
Pasteurella piscicida sp. 6356	12.5	12.5
Pasteurella piscicida p-3347	3.12	12.5

[0012] B) Suppressive activity on cancer cell proliferation The concentrations of epoxyquinomicin A and epoxyquinomicin B that cause 50% cancer cell death (IC_{50}) were determined using various kinds of cancer cells by the MTT method (refer to "Journal of Immunological Methods," 65, 55-60 (1983)). The results are shown in Table 2.

[0013] Table 2

Test cancer cells	IC_{50} (μg/ml)	
	epoxyquinomicin A	epoxyquinomicin B
Mouse leukemia L1200	2.64	16.3
Murine carcinoma IMC carcinoma	9.67	17.9
Murine sarcoma S180	7.67	
Mouse melanoma B16-BL6	7.97	

[0014] As is apparent from the results in Table 1, since the antibiotics epoxyquinomicins A and B according to the present invention have antibacterial activity against various kinds of bacteria, they are useful as antimicrobial agents. Further, as is apparent from the results in Table 2, since epoxyquinomicins A and B have antitumor activity or anti-cancer activity in which proliferation of various kinds of cancer cells are suppressed, they are useful as antitumor agents or anticancer agents.

[0015] Further, according to a second aspect of the present invention, a method is provided for producing the antibiotics epoxyquinomicin A and (or) B, which include the steps of culturing in a nutrient medium a bacterium of the genus Amycolatopsis, which produces epoxyquinomicins A and B of claim 1, and isolating epoxyquinomicins A and (or) B from the resulting culture.

[0016] One example of the epoxyquinomicins A and B-producing bacteria that can be used in a second aspect of the present invention is Amycolatopsis sp. MK299-95F4. This is an actinomycetes strain designed as MK299-95F4, which was isolated by the present inventors from a soil sample collected in Sendai city, Miyagi prefecture, Japan, in October, 1994.

[0017] The microbial properties of MK299-95F4 are as follows:

1. Morphological observation

Substrate hyphae are extensively branched, giving a zigzag appearance. Fragmentation is observed. Aerial hyphae are either straight or irregularly curving, disintegrating into oval- to cylindrical-structures or spore-like structure.

Spores measure about 0.4 to 0.6 μ by 1.1 to 1.6 μ in size and have a smooth surface. Neither verticillate branching nor rhizomorph nor sporangium nor motile spore is observed.

[0018] 2. Growth characteristics in various culture media

The standard given in each of the brackets for the description of color is according to "Color Harmony Manual" of Container Corporation of America.

(1) Sucrose-nitrate-agar culture medium (cultured at 27°C)

White aerial hyphae are thinly formed on the colorless growth. No soluble pigment is observed.

(2) Glucose-asparagine-agar medium (cultured at 27°C)

White aerial hyphae are formed on pale yellow (2 ea, Lt Wheat-2 gc Bamboo) growth. The soluble pigment is tinged with yellow.

(3) Glycerine-aspargine-agar medium (ISP-medium 5, cultured at 27°C)

White aerial hyphae are formed on yellowish brown [3 ie, Camel-31e, and Cinnamon] growth. The soluble pigment is tinged with yellowish brown.

(4) Starch-inorganic salt-agar medium (ISP-medium 4, cultured at 27°C)

White aerial hyphae are thinly formed on the colorless growth. No soluble pigment is observed.

[0019] (5) Tyrosine-agar medium (ISP-medium 7, cultured at 27° C)

White aerial hyphae are formed on the growth of yellowish brown [21g, Mustard Tan] to grayish yellow brown [31g Adobe Brown]. Soluble pigment of pale yellow color is observed.

(6) Nutrient agar medium (cultured at 27°C)

White aerial hyphae are thinly formed on pale yellow [2ea Lt Wheat] growth. No soluble pigment is observed.

(7) Yeast-malt agar medium (ISP-medium 2, cultured at 27°C)

White aerial hyphae are thinly formed on the pale yellowish brown [3ic Amber] growth. No soluble pigment is observed.

(8) Oatmeal agar medium (ISP-medium 3, cultured at 27 °C)

White aerial hyphae are thinly formed on the growth of colorless to pale yellow [1 1/2ca Cream]. No soluble pigment is observed.

(9) Starch agar medium (cultured at 27°C)
White aerial hyphae are thinly formed on the colorless growth. No soluble pigment is observed.
(10) Calcium malate-agar medium (cultured at 27°C)
White aerial hyphae are thinly formed on the colorless growth. No soluble pigment is observed.
[0020] 3. Physiological properties
(1) Temperature range for growth
In the tests conducted using a glucose-asparagine-agar medium (1.0% glucose, 0.05% L-asparagine, 0.05% dipotassium hydrogenphosphate, 3.0% strip agar, pH 7.0) at different temperatures of 10°C, 20°C, 24°C, 27°C, 30°C, 37°C, and 50°C, the MK299-95F4 strain grew at all temperatures tested except 10°C and 50°C. Optimum temperature for good growth appears to be in the vicinity of 27°C.
(2) Hydrolysis of starch (starch-inorganic salt agar medium, ISP-medium 4; and starch-agar medium, each cultured at 27°C)
As a result of 21-day culture, hydrolysis of starch was negative in both the media.
(3) Formation of melanoid pigment (Trypton-yeast broth, ISP-medium 1; peptone-yeast-iron agar medium, ISP-medium 6; tyrosine-agar medium, ISP-medium 7; each cultured at 27°C)
Formation of melanoid pigment was negative in all the media.
[0021] Utilization of various carbon sources (Pridham-Gottlieb agar medium, ISP-medium 9, cultured at 27°C)
D-glucose, D-fructose, inositol, and D-mannitol were utilizable for the growth, whereas L-arabinose, sucrose, rhamnose, raffinose lactose were not utilizable. Whether or not D-xylose was utilizable was not clear.
(5) Liquefaction of calcium malate (calcium malate agar medium, cultured at 27°C)
Liquefaction started at around the tenth day of culture and the effect was moderate.
(6) Reduction of nitrate (aqueous peptone solution containing 0.1% potassium nitrate, ISP-medium 8, cultured at 27°C)

Reduction of nitrate was negative.

[0022] In summary of the microbiological properties described above, the MK299-95F4 strain is morphologically characterized as follows: Substrate hyphae is extensively branched, giving a zigzag appearance. Fragmentation is observed. Aerial hyphae are either straight or irregularly curving, disintegrating into oval- to cylindrical-structures or spore-like structure. Neither verticillate branching nor rhizomorph nor sporangium nor motile spore is observed. White aerial hyphae are formed on the growth of colorless to pale yellow to pale yellowish brown in various media. Soluble pigment is tinged with yellow or yellowish brown in some media. Formation of melanoid pigment, hydrolysis of starch, and reduction of nitrate are all negative.

[0023] The bacterial cell components of the MK299-95F4 strain contain meso-2,6-diaminopimelic acid, arabinose, and galactose in the cell walls, exhibiting type IV cell walls. The reducing sugar in all bacterial cells was type A containing arabinose and galactose. As a result of the glycolate test, it was found to be the acetyl type. Moreover, mycolic acid was not present, phospholipid type was type PII (phosphatidylethanolamine was present; phosphatidylcholine and an unidentified phospholipid containing glucosamine were not), and main menaquinones were MK-9 (H_4).

As for fatty acid, 16:0, i-15:0, 16:1, and i-16:0 and 17:0 were the main components.

[0024] These results suggest that the MK299-95F4 strain belongs to the genus Amycolatopsis(literature: "International Journal of Systematic Bacteriology," 36, 29-37,1986). Searches of the known Amycolatopsis strains revealed that Amycolatopsis sulphurea is a close relative to the MK299-95F4 strain (literature 1: id. and literature 2: "International Journal of Systematic Bacteriology," 37, 292-295, 1987). Thus, comparative analysis is being performed between the MK299-95F4 strain and the Amycolatopsis sulphurea strains that we have reserved. At present, the MK299-95F4 strain is identified as "Amycolatopsis sp. MK299-95F4". The MK299-95F4 strain was

deposited at the National Institute of Bioscience and Human-Technology under the accession number FERM P-15243 in October 17, 1995.

[0025] In implementation of the method of a second aspect of the present invention, the epoxyquinomicins A and B-producing bacterium of the genus Amycolatopsis is inoculated into a nutrient medium, in which the bacterium is cultured. The nutrition medium used here contains a carbon source and nitrogen source that above-mentioned producing bacterium can utilize as nutritive components.

[0026] As the nutrient sources, those typically used as nutrient sources for microorganisms, which are assimilabe nutrients such as carbon sources, nitrogen sources, inorganic salts, etc., can be used. The carbon sources usable include hydrocarbons (e.g., grape sugar, malt sugar, molasses, dextrin, glycerin, and starch) and fats and oils (e.g., soybean oil and peanut oil). The nitrogen sources usable include peptone, meat extract, cotton seed powder, soybean flour, yeast extract, casein, corn steep liquor, NZ-amine, ammonium sulfate, ammonium nitrate, and ammonium chloride. The inorganic salts usable include dipotassium phosphate, sodium phosphate, salt, calcium carbonate, magnesium sulfate, manganese chloride, etc. To these amounts, trace metals, for example, cobalt, iron, etc., can be added if necessary. Further, any other known nutrient source can be used as long as it is useful for the bacteria in producing the antibiotics epoxyquinomicins A and B.

[0027] The percentage of the aforementioned nutrient sources in media is not limited; it can vary widely. The optimal composition and percentage of epoxyquinomicins A and B can easily be determined by those skilled in the art, depending on the epoxyquinomicins A and B-producing bacterium, by performing simple, small-scale experiments. Moreover, the nutrient media composed of the aforementioned nutrient sources can be sterilized in advance of culture. It is advantageous to adjust pH of the medium in the range of 6-8, particularly 6.5-7.5 before or after the sterilization.

[0028] The epoxyquinomicins A and B-producing bacteria can be cultured in such nutrient media according to the methods typically used in the production of antibiotics using common actinomycetes. Usually, culture under aerobic conditions is suitable and it can be performed while stirring and/or aerating. Culture methods that can be used include stationary culture, shaking culture, and submerged culture accompanied by aeration and stirring, but liquid culture is suitable for mass production of epoxyquinomicins A and B.

[0029] Culture temperature that can be used is not limited as long as it is in the range where the growth of the epoxyquinomicins A and B-producing bacterium is not substantially inhibited but is capable of producing the antibiotics. Culture temperature can thus be selected depending on the producing bacteria used, but temperatures in the range of 25°C to 30°C are the most preferable. Culture can usually continued until an adequate amount of epoxyquinomicins A and B has been accumulated. Although the culture duration varies with the composition of the medium, culture temperature, temperature for use, the bacterial strain to be used , etc., but typically, the target antibiotics can be obtained by culturing for 72 to 120 hours.

[0030] The amount of epoxyquinomicins A and B accumulation in medium during culture can be quantified by using Staphylococcus aureus Smith by the cylinder plate method, a method typically used for quantification of antibiotics.

[0031] Epoxyquinomicins A and B thus accumulated in the culture are isolated from the culture in the following manner. After removing bacterial cells from culture by the isolation methods known themselves, such as filtration and centrifugation, if necessary, following culture, the culture filtrate is adjusted to acidity (pH 2-4). The target antibiotics can be recovered through isolation and purification by using solvent extraction with organic solvents, particularly ethyl acetate, etc., adsorption and ion-exchange chromatography, or gel filtration and countercurrent distribution chromatography independently

or in combination. As carriers for adsorption and ion-exchange chromatography, activated charcoal, silica gel, porous polystyrene-divinylbenzene resin, or various kinds of ion exchange resin can be used. In addition, from the isolated bacterial cells, target antibiotics can be extracted, and isolated and purified by solvent extraction using a suitable organic solvent or elution method by bacterial cell disruption in the same manner described above. The novel antibiotics epoxyquinomicins A and B with the above-described properties are thus obtained.

[0032] Further, in a third aspect of the present invention, there is provided an antibacterial agent that contains epoxyquinomicins A and (or) epoxyquinomicin B, represented by the general formula (I), or their pharmaceutically acceptable salt(s) as active ingredient(s).

[0033] Further, in a fourth aspect of the present invention, there is provided an antitumor agent that contains epoxyquinomicins A and (or) epoxyquinomicin B, represented by the general formula (I),or their pharmaceutically acceptable salt(s) as active ingredient(s).

[0034] In this antibacterial agent or antitumor agent, epoxyquinomicins A and (or) B or their (its) salt(s) as active ingredient(s) can be a composition mixed with pharmaceutically-acceptable solid or a fluid carrier in ordinary use, such as ethanol, water, starch, etc.

[0035] Further, in the fifth aspect of the present invention, there is provided Amycolatopsis sp. MK299-95F4, which has the property of producing the antibiotics epoxyquinomicin A and epoxyquinomicin B represented by the aforementioned general formula (I).

[0036]

DESCRIPTION OF THE PREFERRED EMBODIMENTS

The present invention will be more specifically described by giving examples hereinbelow. However, the scope of the present invention is not limited to these examples.

[0037]

EXAMPLE 1

Production of the antibiotics epoxyquinomicins A and B

A liquid medium (pH 7.0) containing 0.5% glycerin, 2% sucrose, 1% soybean flour, 1% dry yeast, 0.5% corn steep liquor, and 0.001% cobalt chloride was placed (110 ml each) in 500 ml Erlenmeyer flasks, and sterilized at 120°C for 20 min by the conventional method. Subsequently, Amycolatopsis sp. MK299-95F4 (FERM P-15243) was taken from its agar slant culture and then inoculated into the aforementioned medium, followed by shaking culture at 30°C for 5 days to obtain a seed culture.

[0038] A liquid medium (pH 7.4) containing 2% glycerin, 2% dextrin, 1% Bacto Soyton, 0.3% powder yeast extract, 0.2% ammonium sulfates, 0.2% calcium carbonate, and one drop of silicone oil was placed (110 ml each) in 500 ml Erlenmeyer flasks, and sterilized at 120°C for 20 min by the conventional method. 2 ml portions of the aforementioned seed culture were inoculated into these media, followed by shaking culture at 27°C for 4 days.

[0039] The resulting culture was filtered to isolate bacterial cells. 2.55 l of the recovered culture filtrate was adjusted to pH 2 with 6N-HCl and then extracted by an equal volume of butyl acetate. The butyl acetate layer was dried with anhydrous sodium sulfate. The butyl acetate was concentrated to dryness under reduced pressure. The residue was dissolved in 50 ml of methanol, washed twice with 5 ml of hexane, and the methanol layer was concentrate to dryness under reduced pressure.

[0040] The resulting residue was separated by chloroform-methanol-water (50:10:40, 100 ml) and the lower layer was concentrated to dryness under reduced pressure to yield a brown oily substance (0.515 g). This oily substance was subjected to silica gel column chromatography (Kieselgel 60, Merck Co., 50 ml) and sequentially eluted with a toluene-acetone mixed solvent (10:1, 7:1, 5:1, 3:1, and 2:1). The resulting active fractions were subjected to silica gel column chromatography under the same conditions and

sequentially eluted with a toluene-acetone mixed solvent (50:1, 20:1, 10:1, and 7:1) to afford a 124 mg mixture containing epoxyquinomicins A and B. 35 mg of this mixture was isolated and purified by silica gel TLC (developing solvent: chloroform-methanol, 20:1).

[0041] Epoxyquinomicin A was obtained as a 20 mg light yellow powder with a melting point of 168-173°C (degradation) and epoxyquinomicin B as a 10 mg light yellow powder with a melting point of 178-184°C (degradation).

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

FIG. 1 shows an ultraviolet absorption spectrum of epoxyquinomicin A in methanol solution.

FIG. 2 shows an ultraviolet absorption spectrum of epoxyquinomicin A in 0.01N NaOH-methanol solution.

FIG. 3 shows an ultraviolet absorption spectrum of epoxyquinomicin A in 0.01N HCl-methanol solution.

FIG. 4 shows an infrared absorption spectrum of epoxyquinomicin A measured by the KBr tablet method.

FIG. 5 shows a proton nuclear magnetic resonance spectrum of epoxyquinomicin A measured with heavy methanol solution (internal standard: trimethyl silane).

FIG. 6 shows a carbon-13 nuclear magnetic resonance spectrum of epoxyquinomicin A measured with heavy methanol solution (internal standard: trimethyl silane).

FIG. 7 shows an ultraviolet absorption spectrum of epoxyquinomicin B in methanol solution.

FIG. 8 shows an ultraviolet absorption spectrum of epoxyquinomicin B in 0.01N NaOH-methanol solution.

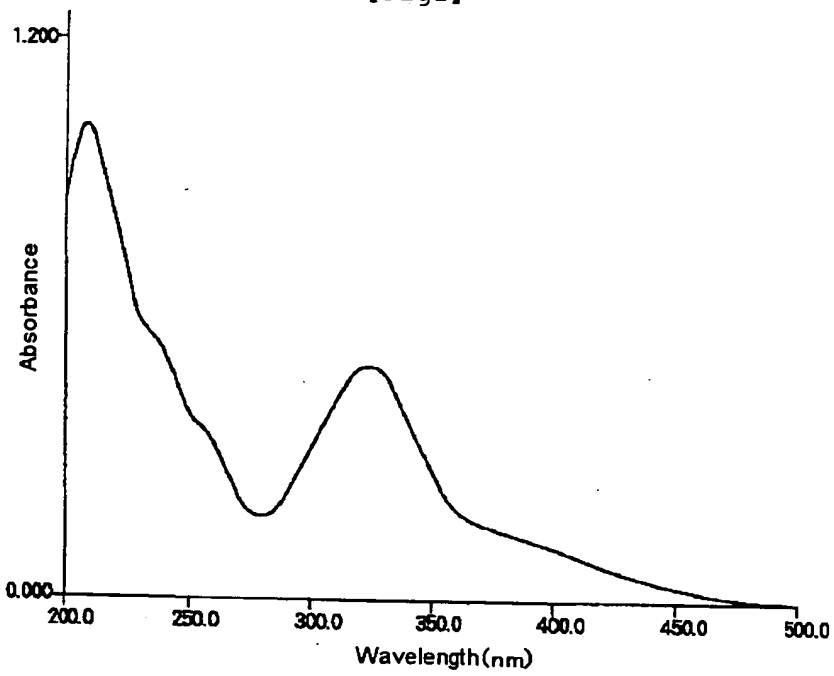
FIG. 9 shows an ultraviolet absorption spectrum of epoxyquinomicin B in 0.01N HCl-methanol solution.

FIG. 10 shows an infrared absorption spectrum of epoxyquinomicin B measured by the KBr tablet method.

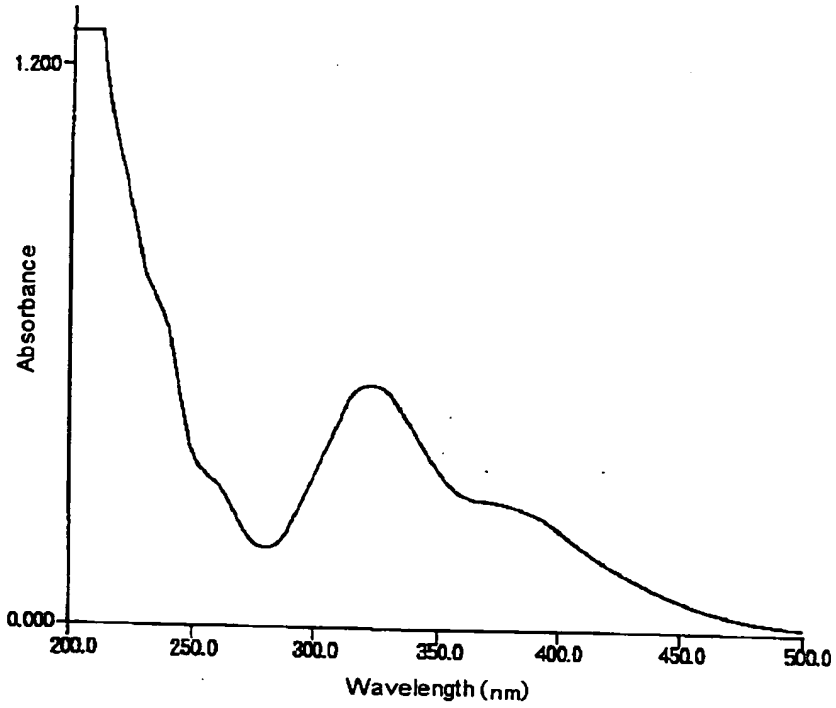
FIG. 11 shows a proton nuclear magnetic resonance spectrum of epoxyquinomicin B measured with heavy methanol solution (internal standard: trimethyl silane).

FIG. 12 shows a carbon-13 nuclear magnetic resonance spectrum of epoxyquinomicin B measured with heavy methanol solution (internal standard: trimethyl silane).

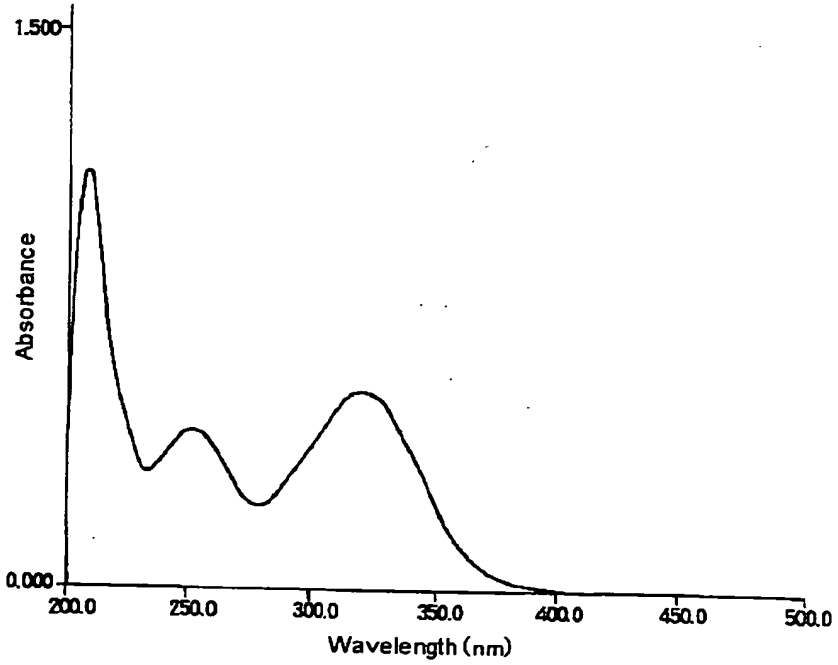
【Fig1】



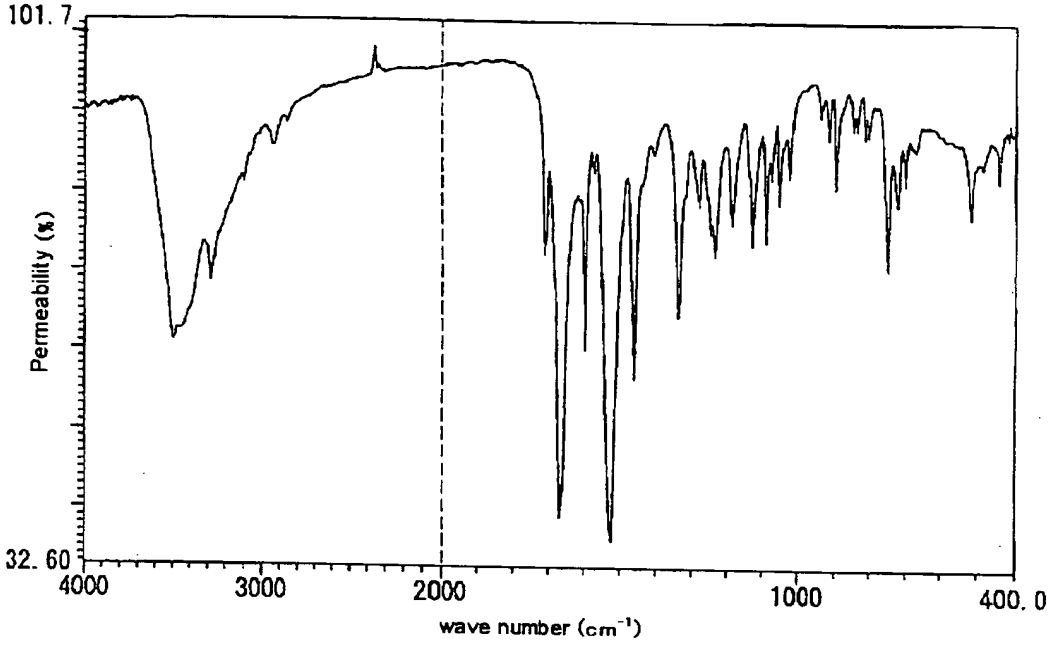
【Fig2】


1.200
0.000
Absorbance
200.0
250.0
300.0
350.0
400.0
450.0
500.0
Wavelength (nm)

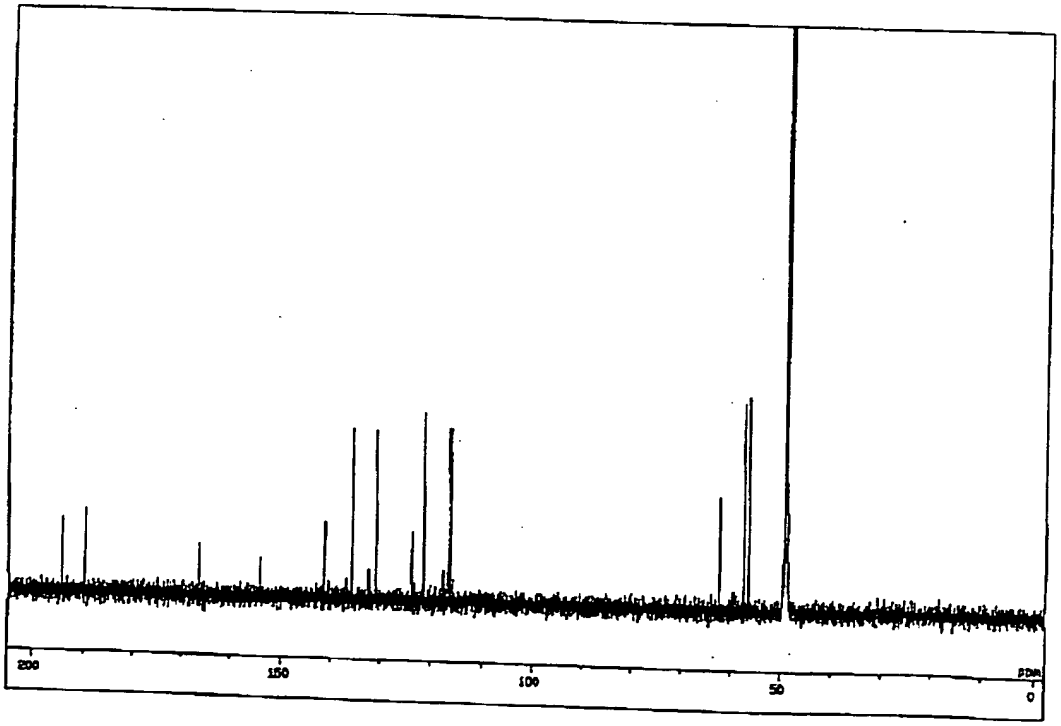
【Fig3】


1.500
0.000
Absorbance
200.0
250.0
300.0
350.0
400.0
450.0
500.0
Wavelength (nm)

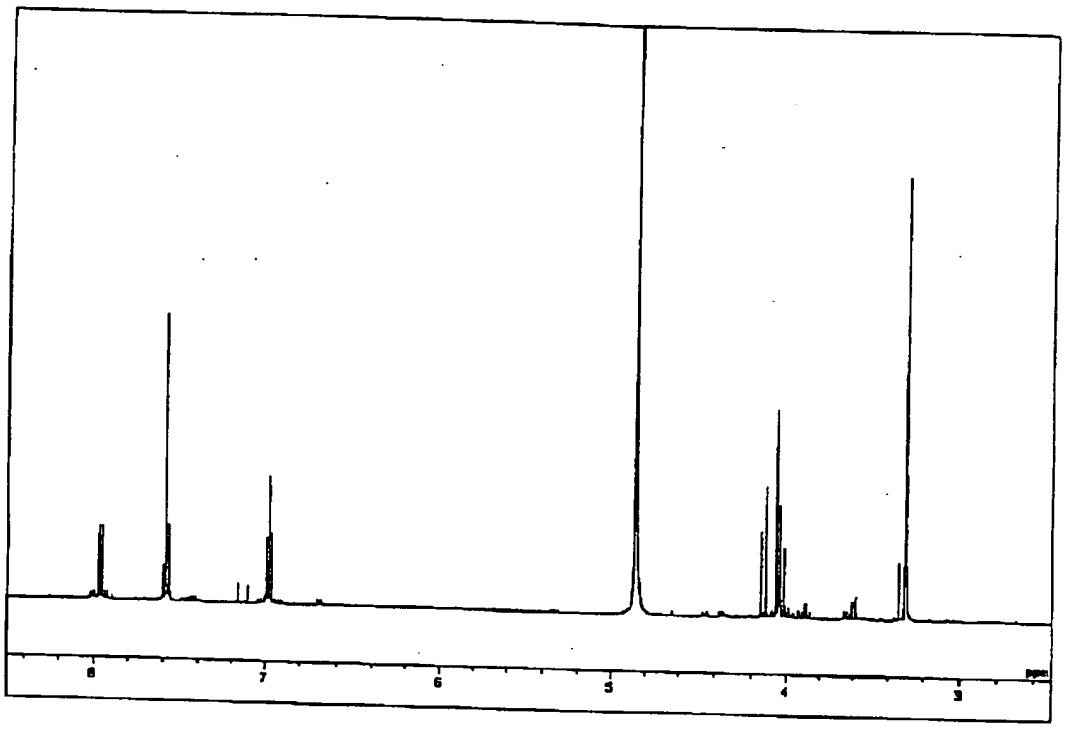
【Fig4】


101.7
Permeability (%)
32.60
4000
3000
2000
1000
400.0
wave number (cm⁻¹)

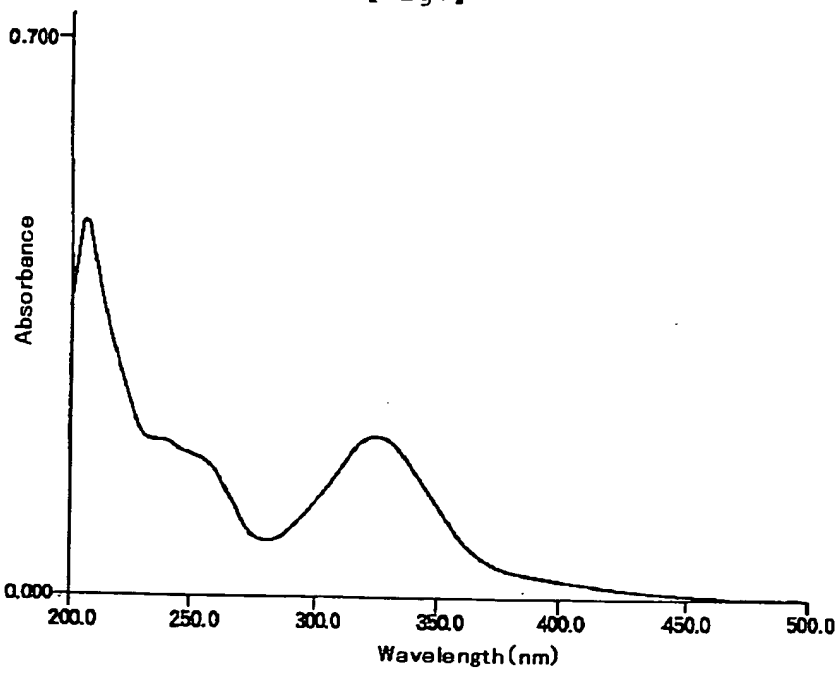
【Fig5】


200
150
100
50
0
ppm

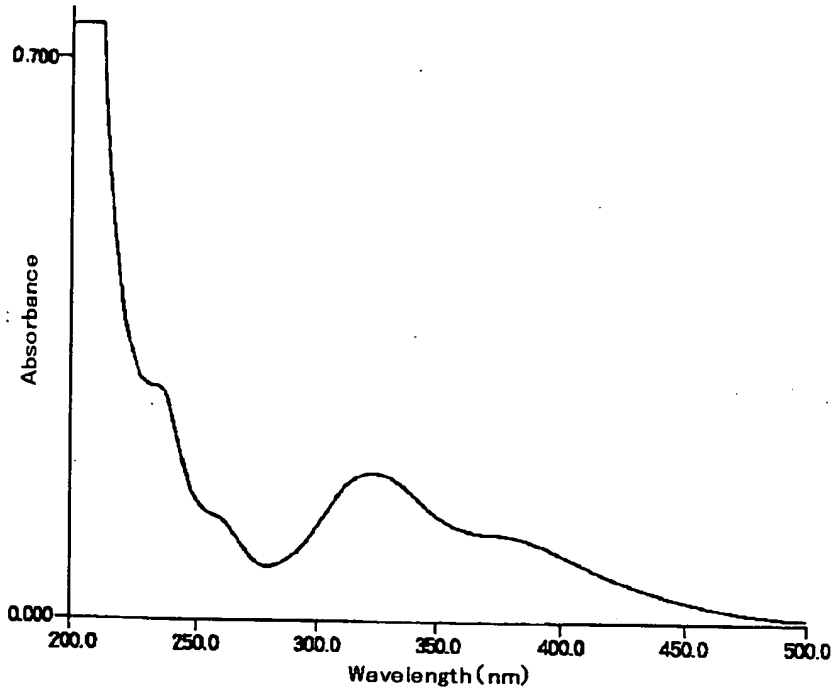
【Fig6】


8
7
6
5
4
3
ppm

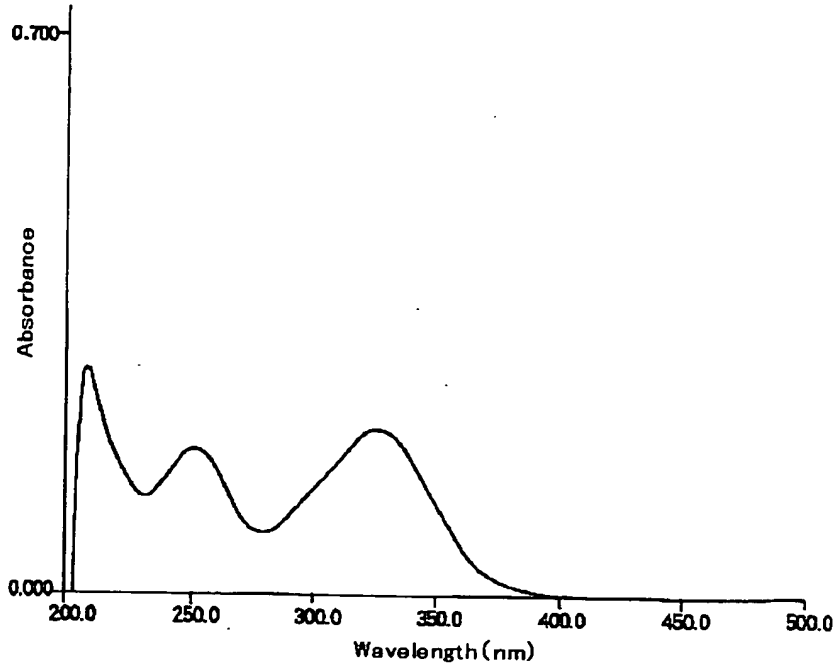
【Fig7】


0.700
0.000
Absorbance
200.0
250.0
300.0
350.0
400.0
450.0
500.0
Wavelength(nm)

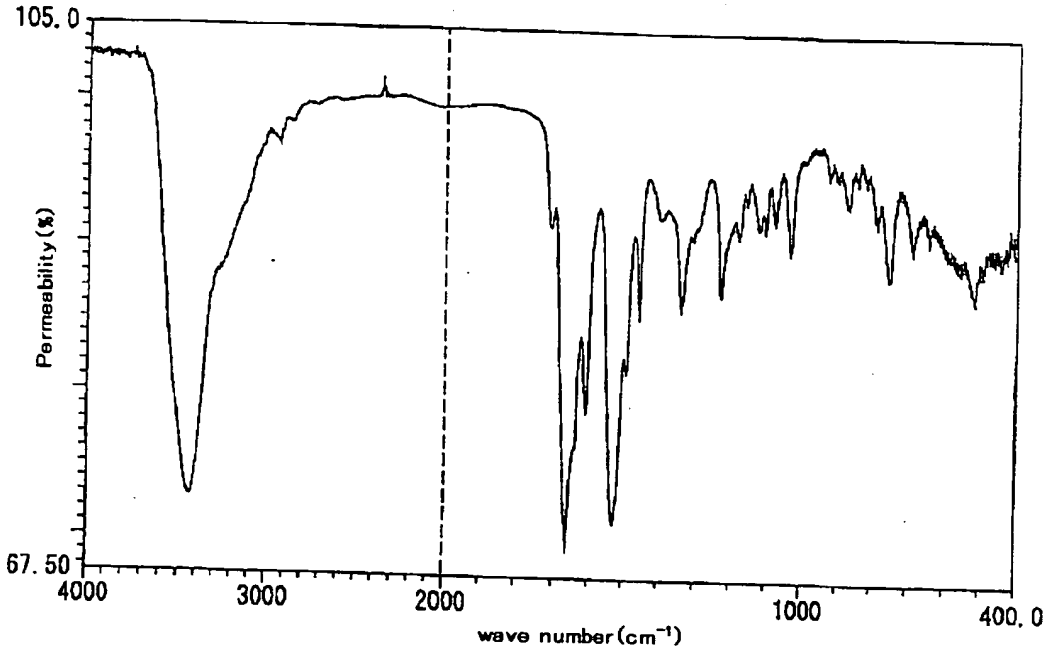
【Fig8】


0.700
0.000
Absorbance
200.0
250.0
300.0
350.0
400.0
450.0
500.0
Wavelength(nm)

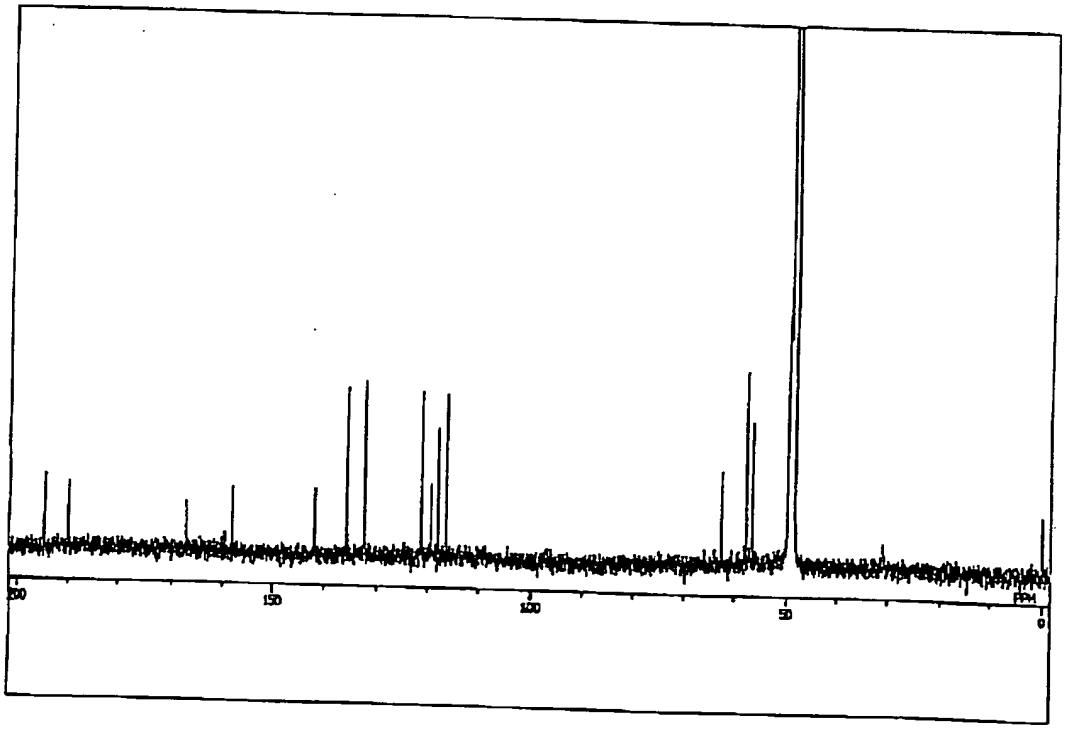
【Fig9】


0.700
0.000
Absorbance
200.0
250.0
300.0
350.0
400.0
450.0
500.0
Wavelength(nm)

【Fig10】


105.0
67.50
Permeability(%)
4000
3000
2000
1000
400.0
wave number(cm⁻¹)

【Fig11】


200
150
100
50
0
PPM

【Fig12】